

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月7日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390260

研究課題名（和文）低酸素応答転写制御ネットワークの網羅的解析による慢性腎臓病の病態生理の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the pathophysiology of chronic kidney disease by comprehensive analysis of the hypoxia-responsive transcriptional network

研究代表者

南学 正臣（NANGAKU MASAOMI）

東京大学・医学部附属病院・特任講師

研究者番号：90311620

研究成果の概要（和文）：siRNA library スクリーニングと ChIP シークエンスおよび microarray により、hypoxia-inducible factor (HIF) の転写制御ネットワークの解析を行った。新規 HIF 調節分子および新規 HIF ターゲット遺伝子の同定に成功し、そのうちの1つである Gene A については、腎細胞癌の予後とよく相関し、細胞質分裂に重要な役割を果たすことを見出した。

研究成果の概要（英文）：We performed analysis of the transcriptional and regulatory network of hypoxia-inducible factor (HIF) by siRNA library screening, ChIP-sequencing, and microarray analysis. Based on these findings, we identified novel HIF regulatory molecules and HIF-1 target genes. Gene A, a novel HIF-1 target gene, showed a good correlation with prognosis of renal cell carcinoma. We also found that gene A plays a crucial role in cytokinesis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,600,000	1,980,000	8,580,000
2010年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2011年度	2,000,000	600,000	2,600,000
-年度	-	-	-
-年度	-	-	-
総計	13,900,000	4,170,000	18,070,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：腎臓学

1. 研究開始当初の背景

日本を含め世界的に透析患者数は増加の一途をたどり、末期腎不全の予備軍となる慢性腎臓病 Chronic Kidney Disease の患者は国民の5～10%と推定され、慢性腎臓病の病

態解明と、その進展機序に対する合理的かつ革新的な治療法の開発は急務となっていた。

この腎臓病のすべての病期における進行機転を説明できる独創的かつ合理的な機序として、「慢性低酸素による慢性腎臓病進行機転」が注目を集めている。このような観点から慢

性腎臓病進行の機序を解明し、それに対する治療法を確立することは学問的に最重要であり、また多数の腎不全患者に対して共通の利益をもたらすものとして社会的影響も計り知れないと考えた。

生体では低酸素状態に対する適応反応として HIF/ Hypoxia Responsive Element (HRE) の転写制御系が、様々な生体防御遺伝子の発現を協調的に制御している。低酸素に対する適応反応は慢性腎臓病のみならず、心疾患や脳血管障害などでも病態生理学的に重要である。更に、癌の内部は乏しい血流にも関わらず細胞が生存していることが問題であり、低酸素に対する応答系は学問的に最もホットな分野の1つとなっている。低酸素に対する転写制御系の果たす役割の詳細な解析を行い、有効な適応応答を誘導する方法を見出すことは、学問的にも臨床応用の観点からも、当時から現在に至るまで非常に重要と考えられている。

2. 研究の目的

研究の目的は、申請者が展開してきた低酸素による腎不全進行機転に関する研究を、これまで蓄積してきた知識・技術及び材料を用いて新展開させ、低酸素応答転写制御ネットワークを明らかにすることである。本研究は、低酸素応答という重要な個別生命現象に焦点を絞って転写制御ネットワークの網羅的解析を行い、これを腎臓病学の病態生理に応用するものとして計画した。

3. 研究の方法

(1) HIF 応答レポーターベクターを恒常的に発現している細胞を利用して siRNA library スクリーニングで新規 HIF 調節分子の網羅的探索を行う。

(2) ChIP シークエンスと microarray を用いて HIF の転写制御ネットワークの解明を行う。

(3) これらの方法で見出した新規 HIF ターゲット分子について、機能解析を行う。

4. 研究成果

(1) HIF 応答レポーターベクターを用いた siRNA library スクリーニングで複数の新規 HIF 調節候補遺伝子を同定した。更に蛋白レベルでの HIF の発現の変化を調べ、特に HIF 調節能の強い5つの新規遺伝子を同定した。

(2) ChIP シークエンスを用いて HIF の転写制御ネットワークの解明を行うため、ヒト血管内皮細胞(HUVEC)を使用し、HIF-1 および HIF-2 に対する特異的抗体を用いて実験を行った。

HIF-2についてはシグナルノイズ比が悪く再現性のある結果が得られていない。HIF-2の抗体の特異性の問題と考えており、現在新たに HIF-2 の抗体の作成を開始している。

一方、HIF-1 については実験条件の最適化に成功し、信頼性のあるデータを得ることができ、低酸素下での HIF-1 結合遺部位を 2060 箇所同定した。同時に、低酸素状態において HIF-1 が正常に発現している細胞と HIF-1 をノックダウンした細胞における microarray 解析の条件を最適化し、480 遺伝子が HIF-1 依存性に発現が変化することを見出した。これらに共通する新規 HIF-1 ターゲット遺伝子を複数同定した。

(3) 現在、siRNA library スクリーニングで見出した新規 HIF 調節分子の具体的な HIF 調節機構に関して研究を進めている。また、ChIP シークエンスと microarray 解析により見出した新規 HIF ターゲット分子の機能解析も進めている。そのうちの1つである Gene A については、tissue array を施行することで腎細胞癌における蛋白レベルでの発現亢進が予後と相関することを見出した。また、GFP との fusion protein を培養細胞に発現させ、Gene A の蛋白産物が細胞質分裂の終期に intercellular bridge に集まること、低酸素では培養細胞のうち多核細胞が増加すること、Gene A をノックダウンすると多核細胞が更に増えることを見出し、Gene A が低酸素状態での細胞質分裂に重要な役割を果たすことを示した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計17件:すべて査読あり)

1. Chiang CK, Tanaka T, Nangaku M: Dysregulated oxygen metabolism of the kidney by uremic toxins. *J Ren Nutr* 22: 77-80, 2012
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1051227611002184>
2. Ikeda Y, Inagi R, Miyata T, Nagai R, Arai M, Miyashita M, Itokawa M, Fujita T, Nangaku M. Glyoxalase I retards renal senescence. *Am J Pathol* 179: 2810-21, 2011
[http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002-9440\(11\)00840-6](http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002-9440(11)00840-6)
3. Chiang CK, Tanaka T, Inagi R, Fujita T, Nangaku M. Indoxyl sulfate, a representative uremic toxin, suppresses erythropoietin production in a HIF-dependent manner. *Lab Invest* 91: 1564-71, 2011
doi: 10.1038/labinvest.2011.114
4. Nishi H, Inagi R, Kawada N, Yoshizato K, Mimura I, Fujita T, Nangaku M. Cytoglobin, a novel member of the globin family, protects kidney fibroblasts against oxidative stress under ischemic conditions. *Am J Pathol* 178:128-39, 2011
[http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002-9440\(10\)00057-X](http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002-9440(10)00057-X)
5. Mimura I, Tanaka T, Wada Y, Kodama T, Nangaku M. Epigenetic regulation for hypoxic response via HIF and histone demethylase. *J Pharmacol Sci* 115: 453-8, 2011
https://www.jstage.jst.go.jp/article/jphs/advpub/0/advpub_10R19FM/_article
6. Mimura I, Nangaku M, Nishi H, Inagi R, Tanaka T, Fujita T. Cytoglobin, a novel globin, plays an anti-fibrotic role in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 299: F1120-33, 2010
<http://ajprenal.physiology.org/cgi/pmidlookup?view=long&pmid=20719976>
7. Palm F, Nangaku M, Fasching A, Tanaka T, Nordquist L, Hansell P, Kawakami T, Nishijima F, Fujita T. Uremia induces abnormal oxygen consumption in tubules and aggravates chronic hypoxia of the kidney via oxidative stress. *Am J Physiol Renal Physiol* 299: F380-386, 2010
<http://ajprenal.physiology.org/cgi/pmidlookup?view=long&pmid=20519374>
8. Kawakami T, Inagi R, Wada T, Tanaka T, Fujita T, Nangaku M. Indoxyl sulfate inhibits proliferation of human proximal tubular cells via endoplasmic reticulum stress. *Am J Physiol Renal Physiol* 299, F568-76, 2010
<http://ajprenal.physiology.org/cgi/pmidlookup?view=long&pmid=20534867>
9. Ohtomo S, Izuhara Y, Nangaku M, Dan T, Ito S, vanYpersele de Strihou C, Miyata T: Body weight control by a high-carbohydrate/low-fat diet slows the progression of diabetic kidney damage in an obese, hypertensive, type 2 diabetic rat model. *J Obesity pii: 136502*, 2010
<http://dx.doi.org/10.1155/2010/136502>
10. Mimura I, Nangaku M: The suffocating kidney: Tubulointerstitial hypoxia in the pathogenesis of end-stage kidney disease. *Nat Rev Nephrol* 6, 667-78, 2010
<http://www.nature.com/nrneph/journal/v6/n11/full/nrneph.2010.124.html>
11. Tanaka T, Nangaku M: The role of hypoxia, increased oxygen consumption, and hypoxia-inducible factor-1 alpha in progression of chronic kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 19, 43-50, 2010
<http://pt.wkhealth.com/pt/re/lwwgateway/landingpage.htm?jsessionid=PnJVzRfCYTWVxT2Lss9z8dqlgJqjn5ymxltQ7RMcJGkdwsJwJKxf!1393764361!181195629!8091!-1?issn=1062-4821&volume=20&issue=5&spage=476>
12. Kawakami T, Inagi R, Takano H, Sato S, Ingelfinger JR, Fujita T, Nangaku M: Endoplasmic reticulum stress induces autophagy in renal proximal tubular cells. *Nephrol Dial Transplant* 24, 2665-72, 2009
<http://ndt.oxfordjournals.org/cgi/pmidlookup?view=long&pmid=19454529>
13. Kumagai T, Nangaku M, Kojima I, Nagai R, Ingelfinger JR, Miyata T, Fujita T, Inagi R: Glyoxalase I overexpression ameliorates renal ischemia-reperfusion injury in rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 296, F912-21, 2009
<http://ajprenal.physiology.org/cgi/pmidlookup?view=long&pmid=19211689>
14. Eto N, Miyagishi Y, Inagi R, Fujita T, Nangaku M: Suppression of MAP3

- kinase 6 mediates anti-angiogenic and tumor-suppressive effects via VEGF repression. *Am J Pathol* 174, 1553-63, 2009
[http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002-9440\(10\)61011-5](http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002-9440(10)61011-5)
15. Kojima I, Tanaka T, Inagi R, Nishi H, Aburatani H, Kato H, Miyata T, Fujita T, Nangaku M: Metallothionein is up-regulated by hypoxia and stabilizes HIF in the kidney. *Kidney Int* 75, 268-277, 2009
<http://dx.doi.org/10.1038/ki.2008.488>
 16. Nangaku M: Novel therapeutic approach targeting the HIF-HRE system in the kidney. *Adv Exp Biol Med* 645, 81-86, 2009
http://dx.doi.org/10.1007/978-0-387-85998-9_13
 17. Tanaka T, Nangaku M: Prolyl hydroxylase inhibitors to active HIF as a novel therapeutic approach against CKD. *J Pharmacol Sci* 109, 24-31, 2009
<http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/jphs/08R09FM?from=PubMed>
- [学会発表] (計 3 6 件)
1. Nangaku M: Abnormal Oxygen Metabolism and Epigenetic changes in Diabetic Kidney Disease. Keystone Symposium on Complications of Diabetes. Boston, U.S.A., 2012. 3. 12 (invited)
 2. Nangaku M: Progression of CKD following AKI: Role of hypoxia. The 44th Annual Meeting of the American Society of Nephrology. Philadelphia, U.S.A., 2011. 11. 10 (invited)
 3. Inagi R, Chiang CK, Tanaka T, Fujita T, Nangaku M: Derangement of Oxygen Sensing for Erythropoietin (EPO) Production by Unfolded Protein Response (UPR). The 44th Annual Meeting of the American Society of Nephrology. Philadelphia, U.S.A., 2011. 11. 12
 4. Tanaka T, Fujita T, Nangaku M: Indoxyl Sulfate Induces Cbp/p300-Interacting Transactivator, with Glu/Asp-Rich Carboxy-Terminal Domain, 2, and Impairs Hypoxia Response in Proximal Tubular Cells. The 44th Annual Meeting of the American Society of Nephrology. Philadelphia, U.S.A., 2011. 11. 12
 5. Shoji K, Mimura I, Ohse T, Murayama T, Inagi R, Wada T, Tanaka T, Kume H, Goto A, Fujita T, Aburatani H, Kodama T, Nangaku M: Identification & Characterization of a Novel Oncogenic HIF-1 Target Involved in Renal Cell Carcinoma. The 44th Annual Meeting of the American Society of Nephrology. Philadelphia, U.S.A., 2011. 11. 12
 6. Mimura I, Inoue T, Wada Y, Kanki Y, Fujita T, Aburatani H, Kodama T, Nangaku M: HIF1 Modulates Chromatin Conformational Change by Recruiting KDM3A and Enhances Regulation of Glucose Transporter 3 in Endothelial Cells. The 44th Annual Meeting of the American Society of Nephrology. Philadelphia, U.S.A., 2011. 11. 11
 7. Ikeda T, Inagi R, Fujita T, Nangaku M: Renal Ischemia Reperfusion Injury Promotes Mid-Term Tubular Senescence. The 44th Annual Meeting of the American Society of Nephrology. Philadelphia, U.S.A., 2011. 11. 10
 8. Nangaku M: Mechanism of the development of renal anemia and its treatment. International Forum of Chronic Kidney Disease of the Taiwan Society of Nephrology. Taipei, Taiwan, 2011. 7. 10 (invited)
 9. Nangaku M: Dysregulated oxygen metabolism of the kidney by uremic toxins. 7th International Congress on Uremia Research and Toxicity. Nagoya, Japan, 2011. 5. 12 (invited)
 10. Tanaka T, Fujita T, Nangaku M: Indoxyl sulfate impairs hypoxia response in cultured proximal tubular cells. 7th International Congress on Uremia Research and Toxicity. Nagoya, Japan, 2011. 5. 12
 11. Chiang CK, Inagi R, Tanaka T, Fujita T, Nangaku M: Indoxyl sulfate, a representative uremic toxin, suppresses erythropoietin production in HIF-dependent manner. 7th International Congress on Uremia Research and Toxicity. Nagoya, Japan, 2011. 5. 12
 12. Nangaku M: Cellular Defense Systems in Hypoxia: Mechanisms for Renal Protection. World Congress of Nephrology. Vancouver, Canada, 2011. 4. 11 (invited)
 13. Ikeda T, Inagi R, Jo A, Ohse T, Miyata T, Manabe I, Nagai R, Fujita T,

- Nangaku M: Glyoxalase I Prevent Age-Related Aortic Medial Thickening by Reducing TGF- β and CTGF Signals Independent of Blood Pressure. The 43rd Annual Meeting of the American Society of Nephrology. Denver, U.S.A., 2010. 11. 20
14. Chiang CK, Nangaku M, Tanaka T, Fujita T, Inagi R: Endoplasmic Reticulum Stress Disturbs Erythropoietin Gene Expression in a HIF-Dependent Manner. The 43rd Annual Meeting of the American Society of Nephrology. Denver, U.S.A., 2010. 11. 19
 15. Mimura I, Nishi H, Tanaka T, Inagi R, Fujita T, Nangaku M: Elucidation of the Anti-Fibrotic Mechanism of a Novel HIF-Regulated Globin, Cytoglobin, with Molecular Genetics. The 43rd Annual Meeting of the American Society of Nephrology. Denver, U.S.A., 2010. 11. 19
 16. Tanaka T, Fujita T, Nangaku M: Impact of Anthracyclines on Hypoxia Response in Tubular Epithelial Cells. The 43rd Annual Meeting of the American Society of Nephrology. Denver, U.S.A., 2010. 11. 19
 17. Muratsu S, Nangaku M, Tanaka T, Chiang CK, Wada T, Fujita T, Inagi R: MicroRNA Profiles of Tubular Cells under Hypoxia-Reoxygenation and Endoplasmic Reticulum Stress. The 43rd Annual Meeting of the American Society of Nephrology. Denver, U.S.A., 2010. 11. 19
 18. Nangaku M, Ikeda Y, Fujita T, Inagi R: Role of carbonyl stress in renal senescence. FASEB Summer Research Conference. Otsu, Japan, 2010. 10. 6
 19. Nangaku M: Defensive mechanisms against fibrosis in the hypoxic kidney. ISN-NEXUS: fibrosis and the kidney. Geneva, Switzerland, 2010. 7. 1 (invited)
 20. Nangaku M: Role of hypoxia in chronic kidney disease. FASEB Summer Research Conference. Saxton River, U.S.A., 2010. 6. 29 (invited)
 21. Nangaku M: HIF and Renal Disease. 12th Asian Pacific Congress of Nephrology. Seoul, Korea, 2010. 6. 6 (invited)
 22. Nangaku M: Identification of novel targets of hypoxia-responsive pathways. ISN-NEXUS: the kidney and the vascular system. Kyoto, Japan, 2010. 4. 17 (invited)
 23. Takano H, Shimizu A, Wakamatsu K, Ishikawa A, Masuda Y, Ishizaki M, Nangaku M, Fukuda Y: Impaired glomerular healing with persistent glomerular inflammation in streptozotocin-induced diabetic nephropathy. ISN-NEXUS: the kidney and the vascular system. Kyoto, Japan, 2010. 4. 17
 24. Mimura I, Wada Y, Tsutsumi S, Aburatani H, Kodama T, Nangaku M: Genome-wide analysis of hypoxic inducible factor 1 binding sites in human endothelial cells under hypoxia. ISN-NEXUS: the kidney and the vascular system. Kyoto, Japan, 2010. 4. 16
 25. Ikeda Y, Nangaku M, Inagi R, Kumagai T, Miyata T, Fujita T: The evaluation of renal senescence and its retardation by the reduction of carbonyl stress. ISN-NEXUS: the kidney and the vascular system. Kyoto, Japan, 2010. 4. 16
 26. Nishi H, Inagi R, Kawada N, Yoshizato K, Mimura I, Miyata T, Fujita T, Nangaku M: Cytoglobin, a novel member of the globin family, protects the kidney fibroblasts against oxidative stress under ischemic conditions. The 42nd Annual Meeting of the American Society of Nephrology. San Diego, U.S.A., 2009. 10. 31
 27. Kawakami T, Inagi R, Fujita T, Nangaku M: Indoxyl sulfate inhibits proliferation of human proximal tubular cells via endoplasmic reticulum stress. The 42nd Annual Meeting of the American Society of Nephrology. San Diego, U.S.A., 2009. 10. 31
 28. Mimura I, Nishi H, Inagi R, Fujita T, Nangaku M: Genome-wide analysis of hypoxic inducible factor 1 binding sites in human endothelial cells under hypoxia. The 42nd Annual Meeting of the American Society of Nephrology. San Diego, U.S.A., 2009. 10. 30
 29. Ikeda Y, Inagi R, Miyata T, Fujita T, Nangaku M: Glyoxalase1 attenuates the impact of renal aging. The 42nd Annual Meeting of the American Society of Nephrology. San Diego, U.S.A., 2009. 10. 30
 30. Palm F, Gutweiler A, Welch WJ,

- Wilcox CS, Nangaku M: Acute Administration of Indoxyl Sulfate Increases the Glomerular Filtration Rate and Reduces Kidney Oxygenation, but without Affecting Renal Blood Flow. The 42nd Annual Meeting of the American Society of Nephrology. San Diego, U.S.A., 2009. 10. 30
31. Ikeda Y, Nangaku M, Kumagai T, Miyata T, Inagi R: Glyoxalase1 attenuates the impact of renal aging. 10th International Symposium on the Maillard Reaction. Cairns, Australia, 2009.8.30
32. Nangaku M: The renin-angiotensin system as a cause of renal hypoxia. World Congress of Nephrology. Milan, Italy, 2009. 5. 24 (invited)
33. Inagi R, Nishi H, Tanaka T, Miyata T, Fujita T, Nangaku M: Hypoxia-induced endoplasmic reticulum stress is ameliorated by glyoxalase I via reduction of intracellular oxidative stress. World Congress of Nephrology. Milan, Italy, 2009. 5. 25
34. Nishi H, Inagi R, Kawada N, Yoshizato K, Miyata T, Mimura I, Fujita T, Nangaku M: Transgenic overexpression of cytoglobin, a novel globin protein, improves tubulointerstitial injury via amelioration of oxidative stress in the hypoxic kidney. World Congress of Nephrology. Milan, Italy, 2009. 5. 25
35. Kumagai T, Nangaku M, Kojima I, Nishi H, Tanaka T, Miyata T, Fujita T, Inagi R: Glyoxalase I overexpression ameliorates renal ischemia-reperfusion injury in rats. World Congress of Nephrology. Milan, Italy, 2009. 5. 24
36. Kawakami T, Inagi R, Takano H, Sato S, Ingelfinger J, Miyata T, Fujita T, Nangaku M: Endoplasmic reticulum stress induces autophagy in renal proximal tubular cells. World Congress of Nephrology. Milan, Italy, 2009. 5. 23

〔図書〕 (計1件)

Miyata T, Eckardt KU, Nangaku M: Humana Press. Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice: Studies on Renal Disorders. 2010, 総ページ数 783

〔産業財産権〕
○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

南学 正臣 (NANGAKU MASAOMI)
東京大学・医学部附属病院・特任講師
研究者番号：90311620

(2) 研究分担者

和田 健彦 (WADA TAKEHIKO)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：90447409
稲城 玲子 (INAGI REIKO)
東京大学・医学部附属病院・特任研究員
研究者番号：50232509
田中 哲洋 (TANAKA TETSUHIRO)
東京大学・保健健康推進本部・助教
研究者番号：90508079

(3) 連携研究者

児玉 龍彦 (KODAMA TATSUHIKO)
東京大学・先端科学技術センター・教授
研究者番号：90170266
油谷 浩幸 (ABURATANI HIROYUKI)
東京大学・先端科学技術センター・教授
研究者番号：10202657